

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-182169

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 23 L 1/305  
// A 23 J 3/10  
A 61 K 37/18  
識別記号  
AAF  
庁内整理番号  
8114-4B  
6712-4B  
6712-4B  
8615-4C

⑭ 公開 平成2年(1990)7月16日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 ペプチド混合物の製造方法

⑯ 特 願 平1-148307

⑰ 出 願 平1(1989)6月13日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)7月7日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-167659

⑳ 発 明 者	木 澤	謙 司	神奈川県小田原市寿町5丁目4番3号	カネボウ自敬寮
㉑ 発 明 者	長 沼	敬 子	神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号	カネボウ瑞穂寮
㉒ 発 明 者	村 上	梅 司	神奈川県小田原市寿町5丁目16番5号	
㉓ 発 明 者	竹 本	平	神奈川県中郡二宮町富士見ガ丘3丁目8番19号	
㉔ 発 明 者	洲 加 本	孝 幸	大阪府大阪市都島区友洲町1丁目6番4-206号	
㉕ 出 願 人	鐘 紡 株 式 会 社		東京都墨田区墨田5丁目17番4号	
㉖ 代 理 人	弁 理 士 若 林 忠			

明 細 書

1. 発明の名称

ペプチド混合物の製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 牛乳カゼインを塩酸中にてペプシンで加水分解し、加水分解反応液のpHを約4に調整して不溶物を除去し、得られる溶液中のペプチド混合物を、弱酸性～弱塩基性の緩衝液で平衡化した陽イオン交換体に吸着させ、次いで弱塩基性～塩基性の溶出溶媒で溶出させて分画することを特徴とする、

(a) pH 1の塩酸水溶液に対する溶解度が100mg/ml以上であり、

(b) pH 9のアンモニア性80%エタノールに対する溶解度が10mg/ml以上であり、

(c) 分子量分布が1100～5400の範囲内にある、塩基性ペプチド混合物またはその塩の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、カゼインから塩基性ペプチド混合物またはその塩を製造する方法に関する。さらに詳しくは、牛乳カゼインを塩酸中にてペプシンで加水分解し、加水分解反応液のpHを約4に調整して不溶物を除去した後、溶液中のペプチド混合物を、弱酸性～弱塩基性の緩衝液で平衡化した陽イオン交換体に吸着させ、次いで弱塩基性～塩基性の溶出溶媒で溶出させて分画することを特徴とする、

(a) pH 1の塩酸水溶液に対する溶解度が100mg/ml以上であり、

(b) pH 9のアンモニア性80%エタノールに対する溶解度が10mg/ml以上であり、

(c) 分子量分布が1100～5400の範囲内にある、塩基性ペプチド混合物またはその塩の製造方法に関する。

本発明の方法で得られるペプチド混合物は、体調調節機能、具体的には、鎮静作用を有しており、該ペプチド混合物を含有せしめた食品は例え

ば機能性食品あるいは健康食品として有用である。

#### 〔従来の技術〕

食品には生命維持に必要な栄養源としての機能と、味覚・嗅覚応答にかかわる感覚機能とがあるが、近年、食品に第3の機能を見い出そうとする動きがある。ここに言う第3の機能とは、高次の生命活動に対する食品の体調節機能のことであり、例えば免疫賦活化機能、アレルギー低減化機能、神経系調節機能、高血圧防止機能、老化抑制機能等が考えられている。そして食品の品質変換操作により得られるものであって、上記の機能を有する成分を含有せしめた食品は機能性食品と呼ばれる。

さて、カゼインは乳汁中に存在する分子量約75000～375000の燐蛋白質であるが、これから体調節機能を有する成分を見い出す試みは既になされている。例えば、Acta Medica Kinki University、第3巻、11頁(1978年)には、カゼインをペプシンで加水分解して得られるもの(以

下、カゼインのペプシン加水分解物と呼ぶ)をSephadex® G-25で分画し、各画分の血圧低下作用を調べたと記載されている。しかし、この画分を特定する具体的な物理化学的性質についてはこの記載からは不明である。また、特開昭60-11425号には、カゼインのペプシン加水分解物から得られる分子量200～1500のペプチド混合物とその血中コレステロール低下作用が開示されている。

しかしながら、上記各開示は、カゼインのペプシン加水分解物の血圧低下作用あるいは血中コレステロール低下作用に関するものでいずれに於いても鎮静作用についての記載はない。

#### 〔発明が解決しようとする課題〕

社会の複雑化に伴ない日常生活においても精神的ストレスが増加傾向にあり、心身を安静に保つ機能、すなわち鎮静作用を有する食品が望まれる様になって来ている。本発明者等はこのような機能を付与した食品、例えば機能性食品あるいは健康食品を提供すべく、牛乳カゼインから鎮静作用を有する成分を製造する方法を検討した。本発明の

3

目的は、鎮静作用を有するペプチド混合物またはその塩の製造方法を提供することにある。

#### 〔課題を解決するための手段〕

本発明者等は、牛乳カゼインをペプシンで加水分解し、得られるペプチド混合物の分画を種々検討した結果、加水分解液をpH約4に調整して不溶物を除去し、次いで陽イオン交換体で分画すると、

- (a) pH 1の塩酸水溶液に対する溶解度が100mg/ml以上であり、
- (b) pH9のアモンニア性80%エタノールに対する溶解度が10mg/ml以上であり、
- (d) 分子量分布が1100～5400の範囲内にある、塩基性ペプチド混合物またはその塩が得られ、これが鎮静作用を有することを見い出し本発明を完成した。

以下、本発明のペプチド混合物の製造方法について説明する。

まず、カゼインをpH1～2の塩酸中、ペプシンを加えて加水分解する。

4

カゼインには、牛乳あるいは脱脂牛乳等から常法によって得られるカゼイン、あるいはこれを精製して得られるαsカゼイン等の牛乳由来のカゼイン(牛乳カゼイン)を用いる。

カゼインに対するペプシンの使用量は、カゼイン1重量部に対して通常0.01～0.05重量部であり、好ましくは0.02～0.03重量部である。なお、ペプシンには、精製されたペプシンばかりでなく、ペプシンを主成分とする酵素製剤、例えば、含糖ペプシン(第十一改正日本薬局方解説書D-214 日本公定書協会監修、広川書店発行 1986年参照)の原末も使用し得るが、この場合は、上記のペプシンに相当する量を用いる。

加水分解反応は、通常35～38℃で30分～3時間、好ましくは37℃で約1時間行なう。

次に、上記加水分解反応液にアルカリ、好ましくは、アモンニア水を添加し反応液のpHを約4に調整し、不溶物を除去してペプチド混合物の溶液(以下、これを加水分解液と呼ぶ)を得る。

次に、陽イオン交換体を用いて上記加水分解液から塩基性ペプチド混合物を分離する。

分離は、これらイオン交換体に加水分解液中のペプチドを吸着させ、次いで溶出溶媒で溶出させこれを分画することにより行なう。この操作は、陽イオン交換体を使用し、カラムクロマトグラフィー（陽イオン交換クロマトグラフィー）で行うことも出来るし、バッチ法で行う事も出来る。

効率良い分画のために、加水分解液および溶出液に0.01～5重量%の割合で非イオン界面活性剤を添加し分画操作を行なうのが好ましい。非イオン界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル等を挙げることが出来る。目的とする画分に混入する非イオン界面活性剤は後記の方法で除去する。

陽イオン交換体には、例えば CM-Sephadex®

C-25、CM-Sephadex® C-50（いずれもファルマシア社製）の如きカルボキシル基を有するイオン交換体（弱酸性陽イオン交換体と呼ぶ）、あるいは SP-Sephadex® C-25、SP-Sephadex® C-50（いずれもファルマシア社製）の如きスルホ基を有するイオン交換体（強酸性陽イオン交換体と呼ぶ）が使用され、好ましくは弱酸性陽イオン交換体が使用される。

まず、陽イオン交換クロマトグラフィーによる分画操作について説明する。

この操作は、加水分解液を弱酸性～弱塩基性、好ましくはpH約8.8に調整した後、緩衝液で平衡化させた陽イオン交換体を充填したカラムに付して加水分解液中のペプチドを吸着させ、次いで溶出溶媒でペプチドを溶出させながらこれを分画することにより行なう。

陽イオン交換体の平衡化は、弱酸性～弱塩基性の緩衝液、好ましくは、pH約8.8の酢酸-アンモニウム緩衝液を使用する。

溶出溶媒には、例えば、酢酸-アンモニウム緩衝

7

液、炭酸アンモニウム水溶液、アンモニウム水溶液等の弱塩基性～塩基性の溶出溶媒を用い、このpHあるいは／および濃度を上昇させながら溶出を行う。目的とする画分は、溶出液のホスホジエステラーゼ阻害活性を指標にして分取する事が出来る。ホスホジエステラーゼ阻害活性の測定は、ウシ肝ホスホジエステラーゼを用い公知の方法により測定する（Analytical Biochemistry, 45巻, 221頁, 1972年参照）。

目的のペプチド混合物は、溶出溶媒のpHあるいは／および塩濃度が高い時に溶出する。例えば、イオン交換体として CM-Sephadex® C-25（ファルマシア社製）を用い、溶出溶媒として炭酸アンモニウム水溶液を用いた場合、目的のペプチド混合物は、炭酸アンモニウム濃度が約0.05Mの時に溶出し始め約0.5Mの時に溶出し終る。

陽イオン交換体を用いたバッチ法による分画は、目的のペプチド混合物がpH約8.8の緩衝液で平衡化した陽イオン交換体に吸着し、その他のペプチド類は吸着しないという性質を利用して有利

8

に実施出来る。

すなわち、まず、pH約8.8に調整した加水分解液を、pH約8.8の緩衝液で平衡化した陽イオン交換体、例えば、CM-Sephadex® C-25に加えて目的のペプチド混合物を吸着させる。しかる後に目的のペプチド混合物が吸着した陽イオン交換体をpH約8.8の緩衝液で洗浄し不要のペプチド混合物を洗い流す。この緩衝液には酢酸-アンモニウム緩衝液が好ましい。

次いで、目的のペプチド混合物が吸着した陽イオン交換体を弱塩基性の溶媒、例えば0.5M炭酸アンモニウム水溶液に加えて目的のペプチド混合物を該溶液中に溶出させた後、陽イオン交換体を除去して目的のペプチド混合物の画分を得る。弱酸性陽イオン交換体の除去は遠心分離等の通常の分離手段で行なう。

上記各分画操作に於いて前記の非イオン界面活性剤を使用した場合は、目的のペプチド混合物の画分から下記の方法で界面活性剤の除去を行なう。すなわち、目的のペプチド混合物の画分を薄

イオン交換体(H<sup>+</sup>型)に接触させてペプチド混合物を吸着させ、水洗により非イオン界面活性剤を洗い出した後に目的のペプチド混合物を希塩酸あるいは塩酸-メタノール水溶液で陽イオン交換体から溶出させる。

目的のペプチド混合物は、これを溶存する画分から通常の手段、例えば、減圧濃縮あるいは凍結乾燥等で溶媒を除去する事により、白色粉状物として得る事が出来る。また、このペプチド混合物は、通常の手段により、酢酸塩、塩酸塩、クエン酸塩、アンモニウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等の食品として許容される塩に変換することが出来る。

本発明の方法で得られるペプチド混合物は分子量分布が1100~5400(ゲルクロマトグラフィー法による)の範囲内にある塩基性ペプチド混合物である。そして、pH 1の塩酸水溶液に対しては100 ng/ml以上の溶解度を、pH 9のアンモニア性80%エタノールに対しては10 ng/ml以上の溶解度を示す。本発明の方法で得られるペプチド混合物が塩

基性ペプチド混合物であることは、その塩酸加水分解物のアミノ酸分析値において酸性アミノ酸に対する塩基性アミノ酸のモル比が1以上であること、および陽イオン交換体(H<sup>+</sup>型)に吸着する事により支持される。

本発明の方法で得られるペプチド混合物およびその塩は、心身の過度な緊張を緩和し心身を安静に保つための食品、例えば機能性食品あるいは健康食品の成分として有用である。

これら食品は、ブドウ糖、水飴、ガムベース、香料、クエン酸、水等の各種食品原料に、本発明の方法で製造されるペプチド混合物を通常0.05~1重量%添加し、常法により清涼飲料水、スポーツ飲料、ジュース等の各種ソフトドリンク、キャンディおよびチューインガム等の形態に製造する事が出来る。なお、本発明で製造されるペプチド混合物またはその塩の添加による風味の低下は無い。

#### [発明の効果]

本発明の方法によると鎮静作用を有し安全性に

1 1

於いて問題のないペプチド混合物が得られる。このペプチド混合物は心身の過度な緊張を緩和し、心身を安静に保つための食品、例えば機能性食品あるいは健康食品の成分として有用である。

本発明の方法で得られるペプチド混合物およびその塩の鎮静作用は、このペプチド混合物をマウスに経口投与すると自発運動を抑制し、またカフェインによる興奮状態を鎮静する(後記試験例1~2参照)が、自発運動を抑制する用量では、筋弛緩作用を示さない(後記試験例3参照)ことにより確認された。また、本発明の方法で得られるペプチド混合物が安全性に於いて問題のないことは、マウスに3 g/kg 経口投与しても毒性は発現しないことから明らかである。

以下に試験例を挙げて本発明の方法で得られるペプチド混合物の有用性を示す。

#### 試験例1 自発運動抑制作用

##### (a) 検体

・ペプチド混合物A・・・実施例1で得た画分IIのペプチド混合物

1 2

##### (b) 試験方法

検体をそれぞれ生理食塩水に溶解し、この溶液を20ml/kg 体重の割合で ddY雄性マウス(5週齢、1群10匹)に投与した(検体の投与量はそれぞれ500ng/kg体重または1000ng/kg 体重)。対照群マウスには生理食塩水のみを20ml/kg 体重の割合で投与した。

次に、実験動物運動量測定装置ACTY-303(バイオメディカ社製)でマウスの自発運動量を測定した。検体投与後15分間に於ける各群の自発運動量の平均値および標準誤差を算出すると共に、検体投与群の自発運動量と対照群の自発運動量との間の有意差検定を行なった。

##### (c) 試験結果

本発明ペプチド混合物は500ng/kg体重および1000ng/kg 体重の投与量で有意に自発運動量を抑制した。各投与群の自発運動量を、対照群の運動量に対する割合(%)で第1図に示す。

#### 試験例2 カフェインによる興奮の抑制作用

##### (a) 検体



- ・ペプチド混合物 A・・・実施例 1 で得た画分 II のペプチド混合物
- ・比較ペプチド混合物 X・・・実施例 1 に於いて画分 II のペプチド混合物を製造する過程で除去した画分 I のペプチド混合物

## (b) 試験方法

ddY 系雄性マウス (5 週齢) を、カフェインおよびペプチド混合物 A の投与群 (CA 群と呼ぶ)、カフェインおよび比較ペプチド混合物 X の投与群 (CX 群と呼ぶ)、カフェインのみの投与群 (C 群と呼ぶ)、および無投与群 (O 群と呼ぶ) の 4 群に分け試験した (1 群各 11 匹)。CA 群あるいは CX 群については、まず生理食塩水に溶解したカフェインをマウスの腹腔内に投与し (カフェイン投与量 10mg/kg 体重、投与液量 10ml/kg 体重)、その 15 分後に本発明ペプチド混合物 A あるいは比較ペプチド混合物 X を生理食塩水に溶解して経口投与した (この溶液の投与液量は 20ml/kg 体重であり、ペプチド混合物の投与量はそれぞれ 1000mg/kg

体重である)。

一方、C 群には上記と同様にしてカフェインを投与し、その 15 分後に生理食塩水 (20ml/kg 体重) のみを投与した。O 群には、最初にかフェインの生理食塩溶液のかわりに生理食塩水 (10ml/kg 体重) のみを、そしてその 15 分後には生理食塩水 (20ml/kg 体重) のみを投与した。投与終了直後より ACTV-303 (バイオメディカ社製) でマウスの自発運動量の測定を開始し、投与終了後 15 分間に於ける各群の自発運動量の平均値および標準誤差をそれぞれ求めると共に、C 群の自発運動量に対する CA、CX および O 群の自発運動量の有意差検定を行った。

## (c) 試験結果

本発明の方法で製造したペプチド混合はカフェインによる興奮を有意に抑制したが、比較ペプチドは有意には抑制しなかった。

カフェイン投与群 (C 群) の自発運動量に対する各投与群の自発運動量の割合 (%) を第 2

1 5

図に示す。なお第 2 図中、無投与群の運動量は 0、カフェインのみの投与群のそれは C、カフェインおよびペプチド混合物 A を投与した群のそれは CA、カフェインおよび比較ペプチド混合物 X を投与した群のそれは CX の記号で示す。

本発明ペプチド混合はカフェインによる興奮を抑制し、鎮静作用を示す。

## 試験例 3 筋弛緩作用

## (a) 検体

試験例 1 に同じ。

## (b) 試験方法

Rotarod 法により測定した。すなわち、まず水平に支えられ毎分 5 回転する直径 3 cm の木製の棒 (rotarod) 上に ddY 系マウスを、回転方向と逆方向に向けて乗せ、1 分以上 rotarod 上に留ることの出来るマウスを選び、これを 1 群 5 匹毎の群に分けた。

次に、検体を蒸留水に溶解し、各群のマウスにこの溶液を 20ml/kg 体重の割合で経口投与し

1 6

た (検体投与量は 500mg/kg 体重、または 1000mg/kg 体重)。なお、対照群マウスには蒸留水のみを経口投与した。

次に、検体を投与してから 15 分後に、上記と同様にしてマウスを rotarod 上に乗せ、1 分間に 2 回以上落下したマウスの数を数えた。

## (c) 試験結果

本発明ペプチド混合物投与群には対照群の場合と同様に、rotarod から落下するマウスは無く、本発明ペプチド混合物は筋弛緩作用を示さなかった。

以上の試験例 1～3 の結果の通り、本発明の方法で得られるペプチド混合物は、自発運動を抑制する投与量で筋弛緩作用を示さない。

## 【実施例】

以下、実施例により本発明を説明する。なお、実施例中の「%」表示は特にことわらない限りは「重量 %」を示す。

また、実施例中、ペプチド混合物の分子量分布は、ゲルクマトグラフィー法 (下記条件の高速

液体クロマトグラフィー)により測定した。

高速液体クロマトグラフ機種：ポンプ、マルチ

ポンプCCPM；検出器、紫外線吸収測定器 UV-

8011 (いずれも東洋曹達株式会社製)。

カラム：Asahipak GS-320、7.8mm x 500mm

(旭化成工業株式会社製)。

溶出溶媒：4 M グアニジノーアセトニトリル

(95:5) 混合溶媒。

検出波長：230nm。

試料注入法：濃度4mg/mlの試料溶液10μlを注入。

標準物質：アルドラーゼ (MW 42000)、リゾチ

ーム (MW 14300)、インスリン B 鎖 (MW 3496)、

ブラジキニンポテンシエータ (MW 1052)、メ

チオニンエンケファリン (MW 574)。

#### 実施例 1

カゼイン (牛乳から常法で得た) 100g を 0.1N 塩酸 2 l に懸濁し、37℃でペプシン 2.5g を加え、同温で1時間攪拌・混合して加水分解反応を行った。

19

液1000ml (Triton® X-100を0.1%含む、pH9.2) に加え、室温で2時間緩やかに攪拌してペプチドを CM-Sephadex® C-25 から溶離した後、上記と同条件の遠心分離により CM-Sephadex® C-25 を除去し、画分Ⅱを得た。

次に、画分Ⅱに含まれているTriton® X-100を除去するために以下の操作を行なった。すなわち、画分Ⅱを減圧濃縮して炭酸アンモニウムを除去後、残渣を水200mlに溶解し、これに CM-Sephadex® C-25 のH型 (CM-Sephadex® C-25を0.5 N 塩酸で処理し、水洗して調製した) 100 mlを加え、室温で緩やかに1時間攪拌してペプチドを吸着させた。次に、ペプチドが吸着した CM-Sephadex® C-25 を水洗し、メタノールと0.3 N 塩酸との混合液 (混合比1:1) 200ml中へ加え、CM-Sephadex® C-25 を除去してペプチド混合物の溶液を得た。

該溶液を減圧濃縮の後、凍結乾燥して白色粉状物としてペプチド混合物3.6gを得た。

このペプチド混合物は以下の物理化学的性質を

反応液のpHを、アンモニア水の添加によって4.0に調整し、生成した沈澱物を遠心分離 (8000 rpm, 15分間) により除去し、上澄液を得た。

次に、該上澄液に、非イオン界面活性剤 [Triton® X-100 (ローム アンド ハース社製)] を0.1%の割合で加えた後、アンモニア水を添加してpH8.6の溶液を調製した。この溶液に、Triton® X-100 を0.1%含む0.1 M 酢酸-アンモニア緩衝液 (pH8.6) で予め平衡化した CM-Sephadex® C-25 (ファルマシア社製) 500ml を加え、室温で1時間攪拌した。

次に遠心分離 (8000rpm、15分間) により、非吸着ペプチドが溶存している上澄液 (画分Ⅰ) を除去した。ペプチドが吸着した CM-Sephadex® C-25を、Triton® X-100 を0.1%含む0.1 M 酢酸アンモニア緩衝液 (pH8.6) に加え混合し、再度遠心分離 (8000rpm、15分間) することにより洗浄した。

次に、ペプチド混合物が吸着している CM-Sephadex® C-25 を0.5 M 炭酸アンモニウム水溶

20

有していた。

分子量分布：1100～5400 (前記のゲルクロマトグラフィー法による測定)

溶解度 (20℃)：pH1の塩酸水溶液に対して100mg/ml以上、pH9のアンモニア性80%エタノールに対して10mg/ml以上。

塩酸加水分解後のアミノ酸分析値 (モル%)：

Lys, 21.2; His, 2.5; Arg, 15.8; Asp, 0.5; Thr, 1.8; Ser, 1.4; Glu, 11.8; Pro, 11.2; Gly, 1.0; Ala, 2.3; Val, 6.7; Met, 1.3; Ile, 2.5; Leu, 13.0; Tyr, 6.1; Phe, 1.8 [アミノ酸の略号は、IUPAC Pure Appl. Chem. 40, 317 (1974) に定められた規則に従う]

なお、ここで得られたペプチド混合物は、以下に示す高速液体クロマトグラフィーによる分析の結果、10種以上のピークが認められたので少なくとも10種以上のペプチドの混合物である。

高速液体クロマトグラフィー条件

機種：ポンプ、CCPM；検出器、UV-8011 (いずれも東洋曹達株式会社製)

カラム : A 3120DS 6mm x 150mm ( Y M C 社 製 )

溶出溶媒 : トリフルオロ酢酸を0.1%含有する  
アセトニトリル水溶液 (アセトニトリル濃度  
15% から35% への直線的濃度勾配)

流速 : 1.5ml/分

検出 : 220nm に於ける吸光度

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の方法で得られるペプチド混合物の自発運動抑制作用を示すものである。

第2図はカフェインによる興奮に対するペプチド混合物の抑制作用を示す図である。図中、Oは無投与群の運動量を、Cはカフェインのみを投与した群のそれを、CAはカフェインおよび本発明の方法で得られたペプチド混合物Aを投与した群のそれを、そしてCXはカフェインおよび比較ペプチド混合物Xを投与した群のそれを示す。

特許出願人 鐘紡株式会社

代理人 若林 忠

23

